

Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra de Querétaro, Querétaro, México

Organochlorine pesticide residues in goat milk from Queretaro, Queretaro, Mexico

Guadalupe Prado Flores* Gilberto Díaz González* Rey Gutiérrez Tolentino*
Salvador Vega y León* Mario Noa Pérez** Eneida Chávez García*

Abstract

The organochlorine pesticide (OP) levels and their metabolites in 40 goat raw milk samples were quantified by gas-liquid chromatography with electron capture detector (ECD Ni⁶³). Milk samples were collected in the Experimental Area of the Queretaro Autonomous University during spring 2003. All the tested samples contained at least one of the OP or their metabolites studied. The upper frequencies found were for heptachlor and its epoxide, endosulfan I and α -HCH with 95.4%, 93.2%, 70.5% and 47.7%, respectively; and the lower frequencies found were for p,p'-DDD, dieldrin, endrin, endosulfan II and endosulfan sulfate with 13.6%, 13.6%, 13.6%, 11.4% and 2.3%, respectively. The higher levels found were endrin aldehyde (48.20 ng/g), γ -HCH (37.75 ng/g), β -HCH (35.98 ng/g) and p,p'-DDD (31.77 ng/g). The OP contents per chemical family were Σ (α , β , γ , δ)-HCH: 114.74 ng/g, Σ (p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE): 66.14 ng/g, Σ (ciclodienics): 128.90 ng/g and Σ (endosulfans): 52.8 ng/g. Sum of heptachlor and heptachlor epoxide (35.65 ng/g) obtained was a fourth of the maximum residue limit (MRL) for cow milk (150 ng/g).

Key words: GOAT MILK, ORGANOCHLORINE PESTICIDES, MEXICO.

Resumen

Se cuantificaron los niveles de plaguicidas organoclorados (PO) y sus metabolitos en 40 muestras de leche cruda de cabra, por cromatografía gas-líquido con detector de captura de electrones (ECD Ni⁶³). Las muestras de leche se obtuvieron de la Unidad Experimental de la Universidad Autónoma de Querétaro, durante la primavera de 2003. En todas las muestras se encontró al menos uno de los PO o sus metabolitos estudiados. Las frecuencias de ocurrencias más altas se encontraron para heptacloro y su epóxido, endosulfán I y α -HCH con 95.4%, 93.2%, 70.5% y 47.7%, respectivamente; mientras las más bajas correspondieron a p,p'-DDD, dieldrín, endrín, endosulfán II y endosulfán sulfato con 13.6%, 13.6%, 13.6%, 11.4% y 2.3%, respectivamente. Los niveles más altos se encontraron para endrín aldehído (48.20 ng/g), γ -HCH (37.75 ng/g), β -HCH (35.98 ng/g) y p,p'-DDD (31.77 ng/g). Los contenidos de PO por familia química fueron: Σ (α , β , γ , δ)-HCH: 114.74 ng/g, Σ (p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE): 66.14 ng/g, Σ (ciclodienicos): 128.90 ng/g y Σ (endosulfanos): 52.8 ng/g. La suma de heptacloro y epóxido de heptacloro (35.65 ng/g) registró la cuarta parte del límite permitido (LMR) para leche vacuna (150 ng/g).

Palabras clave: LECHE DE CABRA, PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS, MÉXICO.

Recibido el 15 de marzo de 2006 y aceptado el 21 de octubre de 2006.

*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F., Teléfono: (01)(55) 5483-7000, ext. 3054, correos electrónicos: gdiaz@correo.xoc.uam.mx - reygut@correo.xoc.uam.mx - svega@correo.xoc.uam.mx - echavez@icmyl.unam.mx

**Departamento de Salud Pública, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Predio "Las Agujas", 44100, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Teléfono: (33)-3777 1151, correo electrónico: mnoa1@yahoo.com

Correspondencia autor responsable: Teléfono: (01)(55)-5483-7519, Fax: 5483 7238, correo electrónico: gprado@correo.xoc.uam.mx

Introduction

The presence of organochlorine pesticides (OP) in milk is current theme in underdeveloped countries, in contrast to developed countries where the use of such compounds has considerably diminish.¹⁻⁸ The studies have been done mostly on human milk, for the relevance that this offers on the newly born, and in bovine milk, for its elevated production and consequent consume in the general population. Nevertheless, goat milk is another lactic alternative, that is produced and commercialized in Mexico. For 2003, FAO estimated a production of 148 thousand metric tons that has been constant for the last ten years.⁹ It is convenient to foresee the possible health impact in consumers by the growing commercialization of food incorporated to the market, that is for the milk itself or by its derivatives, since with it diverse cheese modalities are being elaborated, gaining acceptance among consumers. The studies by Fatichienti and Deiana² have marked a small decrease in such contents when they are industrialized.

Goat milk as food with elevated fat content, is subjected to contamination processes by OP, that come from the use in agricultural and sanitary activities.^{3,10} Due to their known liposolubility and persistence,¹¹ as well as its dangerousness,¹² it is recommended to limit its use in food, in which the maximum residue limit (MRL) should not be exceeded for each pesticide or chemical family. Several studies have reported the presence of OP in human, bovine and industrialized milk fat;^{1,13-17} nevertheless, the studies done on goat milk are scarce and it is considered convenient to evaluate its content, due, among other factors, to the adverse effects provoked by the aforementioned compounds, that refer to metabolic and genetic damage.¹⁸⁻²⁵ In Mexico, it is forbidden the use of OP, such as aldrin, endrin and dieldrin; the use of DDT is restricted, but for other compounds of this family, among them heptachlor, there is no regulation that establishes its use without authority.²⁶ Even though its dangerousness, Mexico has no official legislation that establishes MRL of OP in goat milk or another type, for which, for research purposes, the established CODEX Alimentarius references are adopted.

For the significance and repercussion of consumers' health of this food category, it was pertinent to consider the qualitative and quantitative evaluation of OP residues in goat milk.

Materials and methods

Samplings

During the spring of 2003 the residues of 16 organo-

Introducción

La presencia de residuos de plaguicidas organoclorados (PO) en la leche es un tema vigente en los países en vía de desarrollo, a diferencia de países desarrollados en los cuales se ha disminuido considerablemente el uso de dichos compuestos.¹⁻⁸ Los estudios se han realizado mayormente en leche humana, por la relevancia que ésta ofrece en la alimentación de los recién nacidos, y en leche vacuna, por la elevada producción y el consecuente consumo en la población general. Sin embargo, la leche de cabra es otra alternativa láctea, que se produce y comercializa en México. Para 2003, la FAO estimó una producción de 148 mil toneladas métricas que se mantuvo constante en los últimos diez años.⁹ Es conveniente prever el posible impacto en la salud de los consumidores por la comercialización creciente de alimentos que se incorporan al mercado, ya sea por la leche misma o sus derivados, ya que con ella se elaboran diversas modalidades de queso que van ganando aceptación entre los consumidores. Los estudios de Fatichienti y Deiana² han marcado sólo una pequeña disminución en dichos contenidos cuando son industrializados.²

La leche de cabra, al igual que los alimentos con elevado contenido de grasa, está sujeta a los procesos de contaminación por PO, que provienen de su uso en actividades agrícolas y sanitarias.^{3,10} Debido a su liposolubilidad y persistencia conocidas,¹¹ así como a su peligrosidad,¹² se recomienda limitar el uso en los alimentos, en los que no debe superarse el valor de límite máximo de residuos (LMR) para cada plaguicida o familia química. Diversos estudios han informado sobre la presencia de PO en la grasa de la leche humana, vacuna e industrializada;^{1,13-17} sin embargo, los estudios realizados en leche de cabra son escasos y se considera conveniente valorar su contenido, debido, entre otros factores, a los efectos adversos provocados por los mencionados compuestos, que se refieren a daños metabólicos y genéticos.¹⁸⁻²⁵ En México está prohibido el uso de PO, como aldrín, endrín y dieldrín; se encuentra restringido el uso de DDT, pero para otros compuestos de esta familia, entre ellos el heptacloro, no hay reglamentación que establezca su uso ni su autorización.²⁶ A pesar de su peligrosidad, en México no existe ninguna legislación oficial que establezca valores de LMR de PO en leche de cabra u otro tipo, por lo que, para fines de investigación, se adoptan como puntos de referencia los establecidos por el CODEX Alimentarius.

Por el significado y la repercusión en la salud de los consumidores de esta categoría de alimentos, se consideró pertinente la valoración cualitativa y cuantitativa de residuos de PO en leche de cabra.

chlorine pesticides were identified and quantified in 40 one liter samples of raw milk, obtained from a Nubian breed goat herd, with an average weight of 40 kg, belonging to the experimental station of the Queretaro Autonomous University. The herd was fed with a regimen that consisted of alfalfa, prickly pear, ground corn and water *ad libitum*. The samples were taken in aseptic conditions and were frozen immediately and lyophilized before 48 hours, to be preserved until its analysis.

Extraction and purification of the samples

For OP determination, the referred method of Brunnett *et al.*²⁷ was followed. The lyophilized sample was extracted by means of a Soxhlet system, using n-hexane by reflux for eight hours, at a speed of 2 siphons/h as a minimum. The extracted fatty matter was separated in vacuum rotary vaporizer and dissolved in n-hexane. For purification the Stijve method was followed, recommended by the International Dairy Federation.²⁸ For this, 100 mg of fat obtained previously were passed through a chromatographic column of 300 × 30 mm of internal diameter (ID) packed with Florisil* of 60-100 mesh, previously calcined at 550°C for eight hours and partially deactivated with 4% water. The OP were eluted with 72 mL of hexane solution; 4:1 dichloromethane (v/v), at a flow not greater than 3 mL/min. The eluate was concentrated almost to dryness in the vacuum rotary vaporizer at a temperature of 35°C, solving again the residue in 2 mL of isooctane for pesticides analysis, for its posterior analysis in gas chromatograph.

Chromatographic analysis

A gas chromatograph** with electron capture detector (ECD Ni⁶³) with 3396 model integrator and capillary column SPB-5 (phenyl-methyl-silicon at 5%) of 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm of layer thickness; the injected sample volume in all cases was of 1 µL, and the opening time was of 0.75 min. The operation conditions utilized were the following: injector temperature, 260°C; detector, 320°C; helium (drag gas), 1 mL/min; auxiliary gas, nitrogen at 30 mL/min, the column temperature program was as follows: 90°C (2 min); at 30°C/min up to 180°C (0 min); at 1°C/min up to 200°C; at 10°C/min up to 300°C (3 min).

Quantitative analysis

Quantification was done using the external standard method, calibrating with a standard mix of 16 organochlorine pesticides* obtained at an initial concentra-

Material y métodos

Muestras

Durante la primavera de 2003 se identificaron y cuantificaron los residuos de 16 plaguicidas organoclorados en 40 muestras de leche cruda de 1 L, obtenidas de un rebaño de cabras de raza Nubia, con peso promedio de 40 kg, perteneciente a la estación experimental de la Universidad Autónoma de Querétaro. El rebaño fue alimentado con un régimen que consistió en alfalfa, nopal, maíz molido y agua *ad libitum*. Las muestras se tomaron en condiciones asépticas y fueron congeladas inmediatamente y liofilizadas antes de 48 horas, para conservarlas hasta su análisis.

Extracción y purificación de las muestras

Para la determinación de los PO se siguió el método referido por Brunetto *et al.*²⁷ La muestra liofilizada se extrajo mediante un sistema Soxhlet, utilizando n-hexano mediante reflujo durante ocho horas, a una velocidad de 2 sifoneos/h como mínimo. La materia grasa extraída se separó en evaporador rotatorio con vacío y se disolvió en n-hexano. Para la purificación se siguió el método de Stijve, recomendado por la International Dairy Federation.²⁸ Para ello, 100 mg de la grasa obtenida anteriormente se pasaron por una columna cromatográfica de 300 × 30 mm de diámetro interno (DI) empacada con Florisil* de 60-100 mallas, previamente calcinado a 550°C por ocho horas y parcialmente desactivado con 4% de agua. Los PO se eluyeron con 72 mL de solución de hexano: diclorometano 4:1 (v/v), a un flujo no mayor de 3 mL/min. El eluato fue concentrado casi a sequedad en evaporador rotatorio con vacío a temperatura de 35°C, volviendo a disolver el residuo en 2 mL de isooctano para análisis de plaguicidas, para su análisis posterior en el cromatógrafo de gases.

Análisis cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de gases** con detector de captura de electrones (ECD Ni⁶³) con integrador modelo 3396 y columna capilar SPB-5 (Fenil-metil-silicón al 5%) de 30 m × 0.25 mm DI × 0.25 µm de espesor de capa; el volumen de muestra inyectado en todos los casos fue de 1 µL, y el tiempo de apertura fue de 0.75 min. Las condiciones de operación utilizadas fueron las siguientes: temperatura del inyector 260°C, detector: 320°C; helio (gas de arrastre): 1

*Floridin Co. F9127. SIGMA Chemical Co. St. Louis. MO 63178, Estados Unidos de América.

**Hewlett Packard, modelo 5890 serie II, Estados Unidos de América.

tion of 20 ng/mL of each component. The results were expressed in ng/g of anhydro fat.

Results

In all studied goat milk samples, at least one of the OP or their metabolites were found. The OP with greater frequency were: heptachlor, heptachlor epoxide, endosulfan I and α -HCH, and with less frequency, γ -HCH, DDD, dieldrin, endrin and endosulfan II. The residues of OP with higher values were: endosulfan I, followed by γ -HCH, β -HCH and of p,p'DDD (Table 1 and Figure 1).

Table 2 resumes the pesticides found according to their families. It was observed that the contents of the aromatic pesticides were lower than the ciclodienics.

It was found that the sum of heptachlor and heptachlor epoxide that corresponded to 35.65 ng/g, was only the fourth part of the allowed limit for bovine milk (0.15 μ g/g).

Discussion

In general, low concentrations of OP were found in studied goat milk samples, if they are compared to recently obtained data for Mexican bovine milk,^{3,14} or human milk, for being in the terminal zone of the trophic chains, higher values may be present.^{3,15,17} The estimation of its presence oscillated between 0.29 and 1.11 μ g/L. Even though the size of the sample was limited (n = 40), it offers an exploratory view of the analytic field of toxic residues in goat milk and allows to have an initial datum of the presence of adverse supposed responses to health by the contents of risk substances in this lactic category.

Storelli *et al.*,²⁹ in 49 samples of goat milk, found residues of p,p' DDE and α -HCH, but did not determine the presence of another nine compounds belonging to the DDT and ciclodienics families. In the present study, the 16 residues of OP studied were detected, this evidences that in underdeveloped countries, even if it is prohibited the use of the majority of OP, the residues in foods, as milk, continue to be found.

The averages of p,p'DDE are comparable to the obtained by Storelli *et al.*²⁹ in Italy's goat milk (7.38 $\pm$ 4.8 ng/g). In that study, for α -HCH a value of 0.53 $\pm$ 34 ng/g was found, while in this study it was 33 times greater (17.49 ng/g). Thus, 92% of the samples with residues were found, the concentrations are five and eight times, respectively, below the established limits in Italy.

Likewise, Ragab *et al.*³⁰ registered aldrin and dieldrin in 66% of the goat milk samples analyzed in Egypt, while in this research they were detected in 56.8% of the samples, and the concentrations are, in

mL/min; gas auxiliar: nitrógeno a 30 mL/min, el programa de temperaturas del horno de la columna fue el siguiente: 90°C (2 min); a 30°C/min hasta 180°C (0 min); a 1°C/min hasta 200°C; a 10°C/min hasta 300°C (3 min).

Análisis cuantitativo

La cuantificación se realizó utilizando el método del estándar externo, calibrando con una mezcla estándar de 16 plaguicidas organoclorados,* obtenida a concentración inicial de 20 ng/mL de cada componente. Los resultados se expresaron en ng/g de grasa anhidra.

Resultados

En todas las muestras de leche de cabra estudiadas se encontró al menos alguno de los PO o sus metabolitos. Los PO con las mayores frecuencias fueron: heptacloro, epóxido de heptacloro, endosulfán I y α -HCH, y con menor frecuencia, β -HCH, DDD, dieldrín, endrín y endosulfán II. Los residuos de PO con valores más altos fueron: endosulfán I, seguido de γ -HCH, β -HCH y de p,p'DDD (Cuadro 1 y Figura 1).

El Cuadro 2 resume los plaguicidas encontrados de acuerdo con sus familias. Se observó que los contenidos de los plaguicidas aromáticos fueron más bajos que los ciclodiénicos.

Se encontró que la sumatoria de heptacloro y epóxido de heptacloro que correspondió a 35.65 ng/g, fue apenas la cuarta parte del límite permitido para leche vacuna (0.15 μ g/g).

Discusión

En general, se encontraron concentraciones bajas de PO en las muestras de leche de cabra estudiadas, si se comparan con datos obtenidos recientemente para leche vacuna mexicana,^{3,14} o leche humana, por situarse en la zona terminal de las cadenas tróficas, pueden presentar valores más altos.^{3,15,17} La estimación de su presencia osciló entre 0.29 y 1.11 μ g/L. A pesar de que el tamaño de la muestra fue limitado (n = 40), ofrece una visión exploratoria en el campo de la analítica de residuos tóxicos en leche de cabra y permite tener un dato inicial de la presencia de presuntas respuestas adversas a la salud por los contenidos de sustancias de riesgo en esta categoría láctea.

Storelli *et al.*,²⁹ en 49 muestras de leche caprina, encontraron residuos de p,p' DDE y α -HCH, pero no determinaron la presencia de otros nueve compuestos pertenecientes a las familias del DDT y de los ciclo-

*Chem Service CSM-8880M Chester, PA 19381-0599, Estados Unidos de América.

Cuadro 1 CONTENIDO DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN MUESTRAS DE LECHE DE CABRA (ng/g DE GRASA ANHIDRA; n = 40) ORGANOCHLORINE PESTICIDE CONTENT IN GOAT MILK SAMPLES (ng/g OF ANHYDRO FAT; n = 40)				
<i>Pesticide</i>	<i>% of ocurrence frequency</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Concentration interval</i>
α -HCH	47.7	17.49	64.35	1.04-99.99
β -HCH	25	35.98	110.74	10.83-79.57
γ -HCH	15.2	37.75	60.15	2.08-115.73
δ -HCH	36.3	13.52	62.64	1.08-46.38
p, p'-DDT	15.2	21.08	17.02	1.83-41.91
p,p'-DDD	13.6	31.77	118.75	9.22-110.78
p, p'-DDE	15.2	12.57	44.14	4.77-27.36
Heptachlor	95.4	22.51	52.36	1.59-103.52
Heptachlor epoxide	93.2	13.14	82.07	0.44-65.32
Aldrin	43.2	14.13	105.98	0.25-76.57
Dieldrin	13.6	17.24	35.83	3.21-27.89
Endrin	13.6	13.68	40.60	5.18-17.68
Endrin aldehyde	15.2	48.20	113.47	27.0-80.29
Endosulfan I	70.5	23.99	56.15	0.78-83.27
Endosulfan II	11.4	26.51	19.94	4.62-47.47
Endosulfan sulfate	2.3	*	*	*

* Only one case was registered

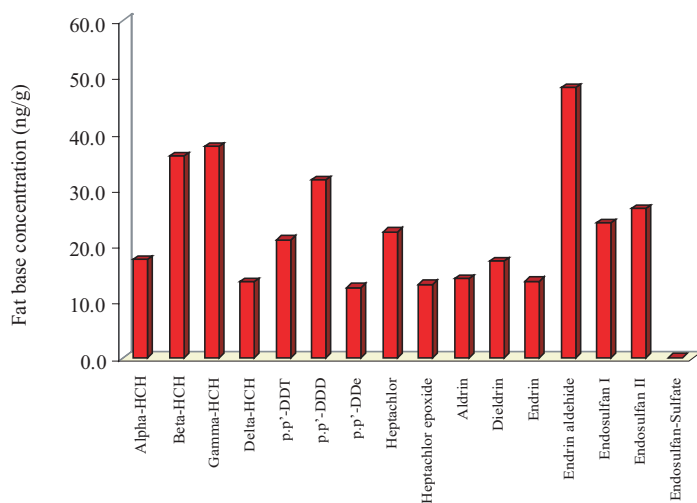


Figura 1: Contenido de plaguicidas organoclorados en grasa anhidra de leche de cabra (ng/g).

Figure 1: Organochlorine pesticide content in anhydro fat of goat milk (ng/g).

the majority of the cases, in the same magnitude order as the previously referred.

It is presumed that the system of production from where goat milk samples were obtained is less technical than the conventional for bovine milk produc-

dienos. En el presente estudio, los 16 residuos de PO estudiados fueron detectados, ello evidencia que en países en vía de desarrollo, aunque está prohibido el uso de la mayoría de los PO, se siguen encontrando sus residuos en alimentos como la leche.

Cuadro 2
CONTENIDO DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS POR FAMILIAS
ORGANOCHLORINE PESTICIDE CONTENT PER FAMILY

<i>Pesticide family</i>	<i>Content (ng/g)</i>
$\Sigma(\alpha, \beta, \gamma, \delta)$ -HCH	114.74
Σ (DDT, DDD y DDE)	66.14
Σ (aldrin, dieldrin, endrin, endrin aldehyde, heptachlor and heptachlor epoxide)	128.90
Σ (endosulfan I, endosulfan II y endosulfan sulfate)	52.8

tion, in which prepared foods, that come from higher profitability technologies, are used, with the aggravating circumstances of containing dangerous residues, which could be considered as a factor that influences in lesser contamination of OP found in this study. In addition to this, the average fat content calculated in the goat milk samples (2.3%) is lower than in bovine milk (3.5%), this is another possible cause that the pesticide residues are lesser in this modality of milk.

The presence of OP in milk has been catalogued as an exposure biomarker of environmental pollution, for its multiple effects on health,^{3,5,18,36} and officially, the presence of these substances is measured in base of anhydro fat, since it is the molecular fraction of its registry. The international and national legislations have established limits in their contents and have suggested strategies to substitute its use by less aggressive products for animal and environmental health.

The toxic capacity of OP fundamentals itself in its chemical structure and lipophilic character, stability and persistence, characteristics that derive in toxicity, accumulation in fat tissues and long life spans. The studies of the metabolism of the organochlorine xenobiotics evidence disorders of diverse nature and there have been found associations between its presence and reproductive, neurological and immune processes. Also they have been associated with cellular growing alterations, even mutagenic and neoplastic processes.^{5,24,31-35}

The metabolism of OP is linked with cytochrome P-450 (CYP). Among the isoforms of CYP, induced by contaminants on rat, CYP1A (1A1 and 1A2); CYP2B (2B1 and 2B2); CYP3A (3A1 and 3A2); CYP4A (4A1,4A2 and 4A3) are found. This family of enzymes correspond to monooxygenase implicated in phenomena of oxidation, hidroxilation and epoxidation of the xentobiotic substances. The isoform CYP1B1 of the cytochrome P-450 is induced by carcinogenic xenobiotics like DDE and estrogens. When studying gen CYP1B1 polymorfisms , it has been found that these substances are responsible for the codon 432.

Los promedios de p,p'DDE son comparables con los obtenidos por Storelli *et al.*²⁹ en leche caprina en Italia (7.38 ± 4.8 ng/g). En ese estudio, para α -HCH se encontró un valor de 0.53 ± 34 ng/g, mientras que en este estudio fue 33 veces mayor (17.49 ng/g). Si bien encontraron 92% de muestras con residuos, las concentraciones están cinco y ocho veces, respectivamente, abajo de los límites establecidos en Italia.

Asimismo, Ragab *et al.*³⁰ registraron aldrín y diel-drín en 66% de las muestras de leche de cabra analizadas en Egipto, mientras que en esta investigación se detectaron en 56.8% de las muestras, y las concentraciones están, en la mayoría de los casos, en el mismo orden de magnitud que las anteriormente referidas.

Se presume que el sistema de producción de donde se obtuvieron las muestras de leche de cabra es menos tecnificado que los convencionales para la producción de leche vacuna, en el que se usan alimentos preparados que provienen de tecnologías de mayor rentabilidad, a costa de contener residuos peligrosos, lo cual podría considerarse como un factor que influye en la menor contaminación con PO que se encontró en este estudio. Adicionalmente, el contenido promedio de grasa calculado en las muestras de leche de cabra (2.3%) es menor que en leche vacuna (3.5%), ésta es otra posible causa de que los residuos de plaguicidas en esta modalidad de leche sean menores.

La presencia de PO en leche se ha catalogado como un biomarcador de exposición de la contaminación ambiental, por sus múltiples efectos sobre la salud,^{3,5,18,36} y oficialmente se mide la presencia de estas sustancias con base en grasa anhidra, ya que es la fracción molecular de su registro. Las legislaciones internacionales y nacionales²⁶ han establecido límites en sus contenidos y han sugerido estrategias para sustituir su uso por productos menos agresivos a la salud ambiental y animal.

La capacidad tóxica de los PO tiene fundamento en su estructura química y su carácter lipofílico, estabilidad y persistencia, características que derivan en toxicidad, acumulación en tejidos grasos y periodos

Women with Val CYP1B1 allele, that have lived near waste incinerators or in contact with agricultural contaminants, show high risk of mammary cancer.³⁹

It has been considered that DDT as well as its more toxic metabolite, the p,p'DDE, are practically present in all the milk samples. When the relation of DDE/DDT was estimated in the mean values of Table 1, it was found that this was of 1:38 and DDD/DDT, of 3.66, which means a slight degradation of the original product on their metabolites. The aromatic pesticides are still frequent on fat products¹⁴⁻¹⁶ and have been associated with certain types of cancer for its xenoestrogenic activity.^{18,19,35}

The International Agency for Research on Cancer (IARC) considers heptachlor as a developer inducer of neoplasms in mice. It biotransforms in its epoxide with the probable damage by oxidative stress, and recent studies have showed information of lesions in DNA, manifested as chromosomal aberrations, micronucleus formation, alterations on apoptosis signals which makes them responsible of cellular proliferation and because of this, neoplasm promoter agents.^{22,24,37-39} Primary cultures of hepatocytes were treated from 0.001 at 100 µM of heptachlor for 24 hours and gave cytotoxic response and mutagenic activity.⁴⁰

The presence of heptachlor and heptachlor epoxide in 95.4% and 93.2% (Table 1) of the samples is considered an objection, but its joint content, that summed 35.65 ng/g, when referred to MRL for bovine milk, situates it in a fourth part of the allowed.

It has been considered that β-HCH, heptachlor and p,p' DDE are endocrine disrupters because they alter glandular activity.^{18,19} In this study, the highest value for β-HCH (55.98 ng/g), which is a metabolism product of lindane insecticide, for commercial use, was found. The studies of Lopez Carrillo *et al.*¹⁷ and Cantor *et al.*²⁴, among other researchers, have valued its influence in some cancer cases.

The studies of Ananya *et al.*⁴¹ point out that when Wistar breed rats are put on treatments between 1.5 to 7 mg/kg/day of lindane for 21 days, effects are manifested in the lipid peroxidation of heart membrane and the endogen antioxidant enzyme concentrations like catalase, superoxide dismutase and the glutathione-S-transferase, are sensibly modified. Likewise, evident histological changes are observed. The ordinary exposures that individuals generally suffer are inferior to this experimental data, but the results point towards the effect that the mentioned pesticides may generate, since all along the trophic chains they are transformed and biomagnified, and its contents are accumulated in the adipose tissue.

The aldrin, dieldrin, endrin OP, members of the ciclodienics family are prohibited in the Mexican

de vida largos. Los estudios del metabolismo de los xenobióticos organoclorados evidencian trastornos de muy diversa naturaleza y se han encontrado asociaciones entre su presencia y procesos de daño reproductivo, neurológico e inmunológico. También se han asociado con alteraciones en el crecimiento celular, hasta respuestas mutagénicas y procesos neoplásicos.^{5,24,31-35}

El metabolismo de los PO está vinculado con el citocromo P-450 (CYP). Entre las isoformas del CYP, inducidas por contaminantes en rata, se encuentran los CYP1A (1A1 y 1A2); CYP2B (2B1 y 2B2); CYP3A (3A1 y 3A2); CYP4A (4A1, 4A2 y 4A3). Esta familia de enzimas corresponde a monooxigenasas implicadas en fenómenos de oxidación, hidroxilación y epoxidación de las sustancias xenobióticas. La isoforma CYP1B1 del citocromo P-450 se induce por xenobióticos carcinogénicos como el DDE y estrógenos. Al estudiar polimorfismos del gen CYP1B1 se ha encontrado que estas sustancias son responsables de la modificación del codón 432. Mujeres con el alelo Val CYP1B1, que han vivido cerca de incineradores de desperdicios o en contacto con contaminantes agrícolas, manifiestan alto riesgo de cáncer mamario.³⁹

Se ha considerado que tanto el DDT como su metabolito más tóxico, el p,p'DDE están prácticamente presentes en todas las muestras de leche. Cuando se estimó la relación de DDE/DDT en los valores promedio del Cuadro 1, se encontró que ésta fue de 1.38 y el DDD/DDT, de 3.66, lo cual significa una ligera degradación del producto original en sus metabolitos. Los plaguicidas aromáticos son todavía frecuentes en productos grasos¹⁴⁻¹⁶ y se les ha asociado con ciertos tipos de cáncer por su actividad xenoestrogénica.^{18,19,35}

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) considera al heptacloro como inductor de desarrollo de neoplasmas en ratón. Se biotransforma en su epóxido con el probable daño por estrés oxidativo, y los recientes estudios han dado información de lesiones en el ADN, manifestadas como aberraciones cromosomales, formación de micronúcleos, alteración en las señales de apoptosis que las hacen responsables de proliferación celular y, por lo mismo, agentes promotores de neoplasias.^{22,24,37-39} Cultivos primarios de hepatocitos fueron tratados desde 0.001 a 100 µM de heptacloro durante 24 horas y dieron respuesta citotóxica y actividad mutagénica.⁴⁰

La presencia de heptacloro y epóxido de heptacloro en 95.4% y 93.2% (Cuadro 1) de las muestras se considera objetable, pero su contenido conjunto, que sumó 35.65 ng/g, al referirlo al LMR para leche vacuna, lo sitúa en una cuarta parte del valor permitido.

Se ha considerado que β-HCH, heptacloro y p,p'DDE son disruptores endocrinos porque alteran

sanitary regulation, for which it is estimated that the found content is not despised, for its induction to toxic responses. Recent researchers in pituitary tumor cells show that nano and picomolar concentrations of dieldrin, endosulfan and o,p-DDE caused specific changes in the intracellular concentration of calcium dependent on voltage, and manifested dependent time patterns and voltage in the prolactin secretion similar to the ones done by the estrogen E₂.⁴²

Epidemiological information shows that the environmental risk factors may be of importance in Parkinson's disease, since they have found presence of aldrin in human brains with PD. Also, heptachlor epoxide expresses a neurotoxic response connected to the dopaminergic routes, by altering the dopamine and gamma aminobutyric acid (GABA). Its degeneration is associated to oxidative stress, mitochondrial disfunction, protein aggregation among the analyzed signals.^{43,44}

The OP of the endosulfan group have been linked to damages in the cellular structure manifested as micronucleus presence, that derived in genetic material alterations.²¹⁻²³ Endosulfan I was present in 71% of the samples, its concentration is not intolerable; while the one for endosulfan II, 11% of the samples expressed a slightly higher value than the first one, but it is acknowledge greater toxic activity.

OP have been the cause of research in damages done in animal and environmental health. Among the ecological damages that have been registered by the action of high levels of OP, there has been information on: presence of these compounds in polar bears; presence of pesticide sulfonide derivatives in marine mammals, which express greater level of toxicity; genus imbalance in species; resistance of more than 300 species to the same pesticide; presence of strictly feminine molecules as vitellogenin are localized in male fish, dog cancer, diminishment in testosterone concentration and morphological changes. For instance, endosulfan produces adrenal toxicity in Rainbow trout, increasing cortisol concentration; interacts with the androgen hAR receptor and produces hypospadias and cryptorchidism, low spermatoc count and low quality.^{12,45-47}

In general terms, the OP, in spite of their agricultural and sanitary uses, manifest severe damages when they are indiscriminately used, but it is difficult to separate their particular effects while doing epidemiological studies or followings. This type of studies can partially explain the relation between the risk factors or the disease. The UN announced for the year 2000, three million poisonings by these xenobiotics, the majority takes place in industrialized countries and by occupational exposure.⁴⁸

The found values in OP residues in goat milk sam-

la actividad glandular.^{18,19} En este estudio se encontró el valor más alto para el β -HCH (55.98 ng/g), que es un producto del metabolismo del insecticida lindano, el cual se usa comercialmente. Los trabajos de López Carrillo *et al.*¹⁷ y Cantor *et al.*,²⁴ entre otros investigadores, han valorado su influencia en algunos casos de cáncer.

Los estudios de Ananya *et al.*⁴¹ señalan que cuando ratas de la raza Wistar son sometidas a tratamientos de entre 1.5 a 7 mg/kg/día de lindano durante 21 días, se manifiestan efectos en la peroxidación de lípidos de membrana de corazón y se modifican sensiblemente las concentraciones de enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa, la superóxido- dismutasa y las glutatión-S-transferasas. Asimismo, se observan cambios histológicos evidentes. Las exposiciones ordinarias que sufren los individuos generalmente son inferiores a estos datos experimentales, pero los resultados orientan en el efecto que los mencionados plaguicidas pueden generar, ya que a lo largo de las cadenas tróficas se transforman y biomagnifican, y su contenido es acumulativo en el tejido adiposo.

Los PO aldrín, dieldrín, endrín, integrantes de la familia de los ciclodienos, están prohibidos en la regulación sanitaria mexicana, por lo cual se estima que el contenido encontrado no es despreciable, por su inducción a respuestas tóxicas. Investigaciones recientes en células tumorales de hipófisis muestran que concentraciones nano y picomolares de dieldrín, endosulfán y o,p-DDE causaron cambios específicos en la concentración intracelular de calcio dependiente de voltaje, y manifestaron patrones dependientes de tiempo y voltaje en la secreción de prolactina semejantes a los realizados por el estrógeno E₂.⁴²

Información epidemiológica demuestra que los factores ambientales de riesgo pueden ser de importancia en la enfermedad de Parkinson, ya que han encontrado presencia de aldrín en cerebros de humanos con PD. También el epóxido de heptacloro expresa una respuesta neurotóxica conectada con las vías dopaminérgicas, al alterar el transporte de dopamina y ácido gamma aminobutírico (GABA). Su degeneración se asocia con estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, agregación de proteínas entre las señales analizadas.^{43,44}

Los PO del grupo del endosulfán se han vinculado con daños en la estructura celular manifestada como presencia de micronúcleos, que derivan en alteraciones en el material génico.²¹⁻²³ Si bien el endosulfán I estuvo presente en 71% de las muestras, su concentración no es intolerable; mientras que para el endosulfán II, 11% de las muestras expresó un valor ligeramente superior al primero, pero se le reconoce mayor actividad tóxica.

Los PO han sido motivo de estudio en daños gene-

ples expressed a basal contamination by the waterways, air, soil and grasslands, feeding and handling of insecticides in agricultural activities and sanitary uses. Nevertheless, it is necessary to keep on observing these compounds for their relevant implication in health, and assess their presence in other country zones, to configure a major representative panorama.

Acknowledgments

Special thanks to Dr. Concepcion Mendez Humaran for her milk samples donation that were used in this study.

Referencias

1. Venant A, Borrel S, Mallet J. Organochlorine compounds contamination in milk and dairy-products from 1975 to 1989. *Lait* 1991;71:107-116.
2. Deiana P, Fatichenti F. Pesticide-Residues in milk processing. *Indust Aliment* 1994;(Suppl 4):43-52.
3. Albert L. Organochlorine pesticides in Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol* 1996;147:1-44.
4. Hoover S. Exposure to persistent organochlorines in Canadian breast milk: a probabilistic assessment. *Risk Anal* 1999;19:527-545.
5. Dewally E, Ayotte P, Bruneau S, Gingras S, Belles-Isles M, Roy R. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ Health Perspect* 2000;108:205-211.
6. Romero ML, Dorea JG, Granja AC. Concentrations of organochlorine pesticides in milk of Nicaraguan mothers. *Arch Environ Health* 2000;55:274-278.
7. Glynn WA, Granath F, Aune M, Atuma S, Darnerud OP, Bjerselius R *et al.* Organochlorine in Swedish women: Determinants of serum concentrations. *Environ Health Perspect* 2003;111:349-355.
8. Tieyu W, Yonglong L, Hong Z, Yajuan S. Contamination of persistent organic pollutants (POPs) and relevant management in China. *Environ Int* 2005;31:813-21.
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Statistical Year Book 2004. Milk and Milk Products. Italy (Rome): FAO, 2004.
10. Baranowska I, Barschanska H, Pyrsz A. Distribution of pesticides and heavy metals in trophic chain. *Chemosphere* 2005;60:1590-1599.
11. Noren K, Meironyte D. Certain organochlorine and organobromine contaminants Swedish human milk in perspectives of past 20-30 years. *Chemosphere* 2003;40:1111-1123.
12. Troisi MG, Haraguchi K, Kaydoo SD, Nyman M, Aguilar A, Borrell A *et al.* Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenylethane (DDE) methylsulfoxides in tissues of seal and dolphin morbillivirus epizootic. *J Toxicol Environ Health* 2001;62: 1-8.
13. Lopez- Carrillo L, Torres-Sanchez L, Lopez-CM, Blair A, Cebrian EM, Uribe M. The adipose tissue to serum dichlorodiphenyldichloroethane (DDE) ratio: some

rados en la salud animal y ambiental. Entre los daños ecológicos que se han registrado por acción de altos niveles de PO, se ha dado información sobre presencia de estos compuestos en osos polares; presencia de derivados sulfonilos de los plaguicidas en mamíferos marinos, los cuales expresan mayor grado de toxicidad; desequilibrios de género en especies; resistencia de más de 300 especies a los mismos plaguicidas; presencia de moléculas estrictamente femeninas como la vitelogenina se ha localizado en peces machos; cáncer en perros, disminución en la concentración de testosterona y cambios morfológicos. Por ejemplo, el endosulfán produce toxicidad adrenal en la trucha Arco iris, aumentando la concentración de cortisol; interacciona con el receptor de andrógenos hAR y produce hipospadias y criptorquidismo, baja cuenta espermática y de baja calidad.^{12,45-47}

En términos generales, los PO, pese al beneficio de sus usos sanitarios y agrícolas, manifiestan daños severos cuando se emplean indiscriminadamente, pero es difícil separar sus efectos particulares al realizar estudios epidemiológicos o de seguimiento. Esta clase de estudios sólo parcialmente puede explicar la relación entre los factores de riesgo y las enfermedades. La ONU refirió para el año 2000, tres millones de envenenamientos por estos xenobióticos, la mayoría sucede en países industrializados y por exposiciones ocupacionales.⁴⁸

Los valores encontrados en los residuos de PO en las muestras de leche de cabra expresaron una contaminación basal por las corrientes de agua, el aire, el suelo, los pastizales, la alimentación y el manejo de insecticidas en las actividades agrícolas y en los usos sanitarios. Sin embargo, es preciso mantener la observación de estos compuestos por su relevante implicación en la salud, y cuantificar su presencia en otras zonas del país, para configurar un panorama de mayor representatividad.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Concepción Méndez Humarán la donación de las muestras de leche que se emplearon en este trabajo.

methodological considerations. *Environ Res Section A* 1999;81:142-145.

14. Prado G, Díaz G, Noa M, Méndez I, Cisneros I, Castañeda F *et al.* Niveles de pesticidas organoclorados en leche humana proveniente de la Ciudad de México. *Agrosur* 2004;32:60-69.
15. Torres AL, Lopez CL, Torres SL, Cebrian M, Rueda C, Reyes R *et al.* Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) Metabolites in maternal milk and their determinant factors. *Arch Environ Health* 2001;54:124-129.

16. Prado G, Noa M, Díaz G, Méndez I, Escobar I, Vega S. Niveles de plaguicidas organoclorados en leche recombinada de la Ciudad de México. *Rev Salud Anim* 2000;23:200-205.
17. Lopez-Carrillo L, Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L, Blair A, Cebrian-Garcia RM. Serum levels of beta-hexachlorinated biphenyls and breast cancer in Mexican women. *Europ J Can Prev* 2002;11:129-135.
18. Kavlock RJ, Daston PG, Derosa C, Fenner-Crips P, Gray L, Kaattari S *et al.* Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996;104:715-740.
19. Topari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillelte JI *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:741-776.
20. Ronco MA, Valdes K, Marcus D, Llanos M. The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. *Toxicology* 2001;159:99-106.
21. Yuquam I, Kanehisa M, Tatsuya T, Toru T, Takeshi S. The genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ Health Perspect* 2000;108:559-561.
22. Pastor S, Creus A, Parron T, Cebulska-Wasilewska A, Csaba S, Piperakis S *et al.* Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003;18:249-258.
23. Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 2003;464:255-262.
24. Cantor PK, Strickland TP, Brock WJ, Bush D, Helzlsouer K, Needham LL *et al.* Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma and prediagnostic serum organochlorines: β -hexachlorocyclohexane, chlordane/heptachlor-related compounds, dieldrin, and hexachlorobenzene. *Environ Health Perspect* 2003;111:179-182.
25. Mourman PG, Terry DD. Consumption of dietary products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Am J Clin Nutr* 2004;80:5-14.
26. CICOPLAFEST, Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. México (DF): Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Secretaría de Desarrollo Social, Secretaría de Salud, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2005.
27. Brunetto R, Leon A, Burguera JL, Burguera M. Levels of DDT in human milk of Venezuela women from various rural populations. *Sci Total Environ* 1996;186:203-207.
28. International Dairy Federation (IDF). International IDF Standard 75C. Milk and milk products. Recommended methods for determination of organochlorine compounds (pesticides). Brussels (Belgium): IDF General Secretariat, 1991.
29. Storelli MM, Storelli A, Marcotrigiano GO. Polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene and organochlorine pesticides residues in milk from Apulia. *Ital J Food Sci* 2001;13:113-117.
30. Ragab AA, Abdel Latif MS, Ibrahim AMA, Smith CJ. Indirect competitive ELISA for the quantitative and qualitative analysis of aldrin/dieldrin in Egyptian milk samples from different farm animal species. *Food Agric Immunol* 1996;8:273-278.
31. Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM *et al.* Pesticide exposure and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 1990;50:6585-6591.
32. Blair A, Zahm SH. Agricultural exposure and cancer. *Environ Health Perspect* 1995;103:205-208.
33. Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF, Fraumeni J Jr. Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand J Work Environ Health* 1992;18:209-215.
34. Vera GV, Davor Z. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res* 2000;469:279-285.
35. Massart F, Harrel JC, Federico G, Saggese G. Human breast milk and xenoestrogens exposure: a possible impact on human's health. *J Perinat* 2005;25:282-8.
36. Gil HF. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Rev Toxicol* 2000;17:19-26.
37. Laouedj A, Schenk C, Pfohl-Leszkowicz A, Keith G, Schontz PG, Rether B. Detection of DNA adducts in declining hop plants grown on fields formerly treated with heptachlor, a persistent insecticide. *Environ Pollut* 1995;90:409-414.
38. Rough SE, Yau PM, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY. Effect of the chlorinated hydrocarbons heptachlor, chlordane and toxaphene on retinoblastoma tumor suppressor in human lymphocytes. *Toxicol Lett* 1999;104:127-35.
39. Saintot M, Malaveille C, Hautefeuille A, Gerber M. Interaction between genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and environmental pollutants in breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:83-6.
40. Okoumassoun LE, Bates DA, Marion M, Denizeau F. Possible mechanisms underlying the mitogenic action of heptachlor in rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;193:356-369.
41. Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. *Med Sci Monit* 2005;11:325-9.
42. Wozniak AL, Bulaveva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca^{+2} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 2005;113:431-9.
43. Kanthasamy AG, Kitazawa M, Kanthasamy A, Anantharam V. Dieldrin-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Neurotoxicology* 2005; 26:701-19.

44. Carr RL, Couch TA, Liu J, Coats JR, Chambers JE. The interaction of chlorinated alicyclic insecticides with brain GABA(A) receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J Toxicol Environ Health A 1999; 56:543-53.
45. Guillete LJ Jr, Brock JW, Rooney AA, Woodward AR. Serum concentrations of Various Environmental Contaminants and their Relationship to Sex Studied Concentrations and Phallus Size in Juvenile American Aligators. Arch Environ Contam Toxicol 1999 ;36:447-455.
46. Oskam IC, Ropstad E, Dahl E, Lie E, Derocher AE, Wiig O *et al.* Organochlorines affect the major androgenic hormone, testosterone, in male polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. J Toxicol Environ Health 2004; 25; 67:959-77.
47. Lemaire G, Balaguer P, Michel S, Rahmani R. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. Toxicol Appl Pharmacol 2005 ;202:38-49.
48. He F. Neurotoxic Effects of Insecticides-Current and Future Research: A review. Neurotoxicology 2000;21:829-836.